

Produção e Armazenamento de Nematoides Entomopatogênicos



ISSN 1678-1953

Dezembro, 2015

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 202

Produção e Armazenamento de Nematoides Entomopatogênicos

Aldomário Santo Negrison Junior
Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrison
Ana Paula Pereira de Oliveira Silva

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Aracaju, SE
2015

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250, CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1300
Fax: (79) 4009-1369
www.embrapa.com.br
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações

Comitê Local de Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente: *Marcelo Ferreira Fernandes*

Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Carlos Alberto da Silva, Elio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, João Gomes da Costa, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto de Araujo Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo*

Supervisão editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Normalização bibliográfica: *Josete Cunha Melo*

Editoração eletrônica: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Foto da capa: *Aldomário Santo Negrísoli Junior*

1ª Edição

On-line (2015)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Produção e Armazenamento de Nematoides Entomopatogênicos/
Aldomário Santo Negrísoli Júnior ... [et al.] – Aracaju : Embrapa
Tabuleiros Costeiros, 2015.

24 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN
1678-1953; 202).

Disponível em: <<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>>

1. Cana-de-açúcar. 2. Doença. 3. Praga. 4. *Galleria mellonella*.
I. Negrísoli Junior, Aldomário Santo. II. Negrísoli, Carla Ruth de
Carvalho. III. Silva, Ana Paula Pereira de Oliveira. IV. Série.

CDD 633. Ed. 21

©Embrapa 2015

Autores

Aldomário Santo Negrison Junior

Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitossanidade/Entomologia, pesquisador Unidade de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo, AL

Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrison

Bióloga, doutora em Fitossanidade/Entomologia, bolsista da Unidade de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo, AL

Ana Paula Pereira de Oliveira Silva

Bióloga, mestre em Agricultura e Ambiente, bolsista da Unidade de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo, AL

Apresentação

Diversos são os desafios que a agricultura enfrenta em dias onde há a crescente demanda de alimentos, fibras, etc, juntamente com a necessidade da desaceleração no uso irrestrito dos recursos naturais. Nesse contexto cada vez mais complexo, figuram os insetos-praga que se apresentam, na maioria das vezes, como importantes fatores de redução da produtividade da maioria das plantas cultivadas, apesar de muitas vezes também representarem o contrapeso no sistema agrícola, na condição de inimigos naturais.

Além dos parasitoides e predadores de insetos, os entomopatógenos são um grupo de organismos de extrema importância para a produção agrícola, pois se contrapõem ao grande desequilíbrio ecológico provocado pela agricultura intensiva e representam uma alternativa menos impactante quando do manejo de pragas. Os grupos mais conhecidos e reconhecidos são os fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas, devido ao maior interesse e aplicação de estudos de pesquisa, desenvolvimento e tecnologia, havendo alguns exemplos de programas de sucesso de controle biológico de pragas com base nesses organismos no Brasil e no mundo.

Não menos importantes são os nematoides entomopatogênicos, especificamente das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, que fazem parte do grupo dos controladores microbianos de insetos e que apresentam algumas características biológicas que os diferenciam dos demais, tornando-os mais vantajosos em determinados patossistemas. Da mesma forma que os outros entomopatógenos, por se tratar de animais

vivos, apresentam exigências específicas para que possam alcançar os objetivos quando aplicados nas lavouras. Dois destes aspectos para o sucesso no uso desses agentes são a produção e o armazenamento (em baixa e larga escalas), representando dois dos principais “gargalos” enfrentados pelas empresas que comercializam esses produtos em todo o mundo.

Finalmente, a proposta desta publicação é colocar em pauta as questões relacionadas à produção in vivo e in vitro, bem como as formas de armazenamento dos nematoides entomopatogênicos, suas implicações e os avanços que têm sido realizados. Além disso, as perspectivas de estudos que devem ser fomentadas, principalmente no Brasil, onde essa ciência é relativamente nova e promissora.

Manoel Moacir Costa Macêdo

Chefe-geral da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Sumário

Produção e Armazenamento de Nematoides Entomopatogênicos	7
Introdução.....	7
Criação do inseto hospedeiro <i>Galleria mellonella</i> (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)....	8
Produção dos nematoides entomopatogênicos	10
Produção in vivo – lagartas de <i>G. mellonella</i>	10
Produção in vitro – meio de cultura.....	12
Coleta e armazenamento	13
Perspectivas	16
Referências	18

Produção e Armazenamento de Nematoides Entomopatogênicos

Aldomário Santo Negrisol Junior

Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrisol

Ana Paula Pereira de Oliveira Silva

Introdução

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs), também conhecidos como nematoides parasitos de insetos, representam um grupo de organismos muitas vezes desconhecido pelo público em geral e até mesmo no meio acadêmico e científico, no Brasil. Esse fato pode ser explicado por dois motivos principais, o primeiro advém dos poucos pesquisadores especialistas dedicados ao grupo e o segundo, à recente história de pesquisa em nosso país, os quais despertaram interesse da comunidade científica há menos de 20 anos, tempo insuficiente quando nos referimos à ciência.

Das dezenas de gêneros de NEPs já descritos, dois se destacam: *Heterorhabditis* (POINAR, 1976) e *Steinernema* (TRAVASSOS, 1927). O maior interesse nesses dois gêneros é devido à possibilidade de serem produzidos em escala industrial, bem como a formulação em produtos comercializáveis. Além disso, como são entomopatógenos específicos, isto é, atacam somente insetos, são seguros ao ambiente, ao aplicador e ao consumidor final. Outra particularidade é a associação mutualística com bactérias simbiotes que proporcionam aos NEPs a capacidade bioinseticida, provocando a morte do hospedeiro entre 24 a 48 horas após a aplicação, chegando a alguns casos, a ser substituintes aos inseticidas sintéticos. Esta associação beneficia ambos os organismos, pois as bactérias, apesar de terem alta capacidade entomopatogênica, perderam, ao longo da coevolução com os nematoides, a capacidade de infectar os insetos sem o concurso dos nematoides. Por outro lado, os nematoides, com a esta associação tornaram-se mais eficientes, pois as bactérias potencializam a capacidade entomopatogênica destes.

Nesse segmento, o uso de NEPs possibilita o controle de pragas com menos impactos ecológicos (LIESCH; WILLIAMSON, 2010), sendo utilizados com sucesso contra inúmeras pragas em diversos tipos de sistemas agrícolas. As diferentes espécies e isolados de NEPs, muitas vezes, altamente variáveis em termos da eficácia e persistência, podem ser altamente sensíveis a fatores ambientais. Por esse motivo, há a necessidade da constante avaliação da sua eficiência contra o inseto alvo com base na disponibilidade no mercado destas espécies e isolados mais adequados ao inseto-alvo para sua utilização (MOLYNEUX, 1985, SHETLAR et al., 1988, KUNG et al., 1991, GAUGLER et al., 1992, LEWIS et al., 2006, KOPPENHOFER et al., 2007). Dessa forma, o objetivo desta publicação é abordar os aspectos gerais sobre a produção dos nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, como forma de subsidiar os estudos necessários dos programas para desenvolvimento de produtos utilizando estes agentes de controle biológico.

Criação do inseto hospedeiro *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyrallidae)

O uso de insetos na produção de NEPs é fundamental, pois estes são o substrato de multiplicação dos nematoides, sendo a traça-dos-favos *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) a espécie atualmente mais utilizada, devido à sua relativa facilidade de criação em laboratório e sua suscetibilidade à maioria das espécies de NEPs (GAUGLER; HAN, 2002).

A criação desse inseto deve ser realizada em condições controladas, em sala climatizada (28 ± 2 °C, UR 70%) e sem luminosidade, utilizando recipientes de alumínio com tampas com telas de aço com malha de 12 mm² e a dieta artificial à base de ingredientes necessários ao desenvolvimento completo: 192,6 g de fubá, 94,0 g de levedura de cerveja, 80,2 g de farinha de soja, 48,2 g de leite em pó desnatado, 47,0 g de favo-de-mel ou mel industrializado, 236,0 g de mel e 208,0 g de glicerina (PARRA, 1998) (Figura 1).

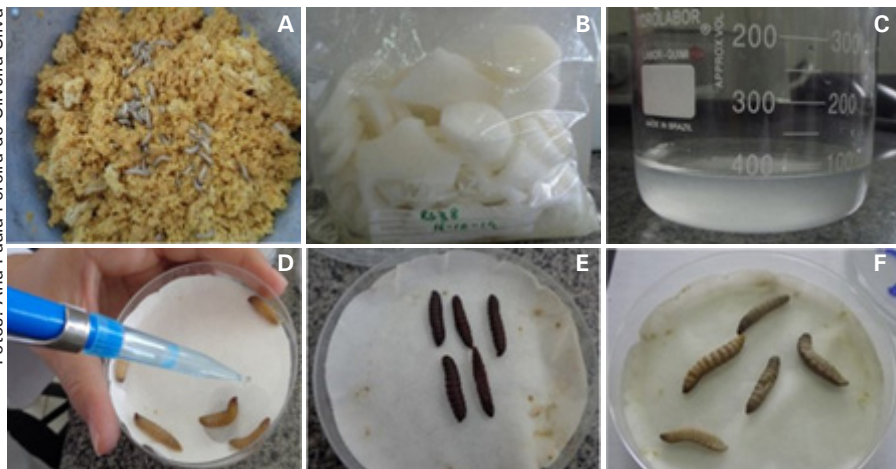


Figura 1. A - lagartas da traça-dos-favos *Galleria mellonella* em dieta artificial. B – NEPs em sacos “zip-lock” em esponjas de poliuretano. C – Suspensão de juvenis infectantes (JIs) de NEPs. D - Inoculação de NEPs em lagartas de *G. mellonella*. E – Lagartas mortas infectadas por NEP do gênero *Heterorhabditis* (cor avermelhada). F – Lagartas mortas infectadas por NEP do gênero *Steinernema* (cor amarelada a acinzentada).

A dieta deve ser preparada com a mistura de todos os ingredientes secos, sendo posteriormente acrescentados a glicerina e o mel, como ingredientes líquidos. De preferência, as lagartas devem ser alimentadas diariamente, oferecendo a quantidade necessária ao consumo diário, de forma a evitar o excesso desse alimento que pode fermentar e ser misturado com as fezes, já que as lagartas passam todo seu desenvolvimento no mesmo recipiente. Para evitar a mistura com excrementos, a dieta nova deve ser depositada sobre a do dia anterior, pois as lagartas forrageiam, formando camadas de excrementos no fundo do recipiente.

Por ocasião da pupação, as lagartas deslocam-se para a periferia superior do recipiente e na tampa, tecem casulo para pupar, suspendendo sua alimentação. Em poucos dias, a depender da temperatura, surgem os adultos. Nesse momento, devem ser confeccionadas “sanfonas” de papel dobradas (22 cm x 16 cm) de preferência de textura lisa e colocadas no interior dos recipientes para

que as fêmeas coloquem seus ovos. Diariamente, ou em até quatro dias, as sanfonas devem ser retiradas e logo após passam pelo banho de sulfato de cobre a 1 %, para eliminar possíveis contaminantes (fungos, bactérias e ácaros) e, colocadas em novos recipientes de alumínio, contendo nova dieta, possibilitando uma nova criação desse inseto.

As temperaturas ideais para o desenvolvimento de cada estágio de desenvolvimento do inseto são: ovo = 27 °C, lagarta e pupa = de 22 °C a 32 °C, sendo esta variação de temperatura utilizada com o objetivo de acelerar ou retardar o desenvolvimento do inseto como forma de sincronizar a oferta de lagartas para multiplicação dos nematoides.

Considerando que os NEPs são multiplicados em lagartas de último ínstar de *G. mellonella* e que as mesmas desenvolvem grande quantidade de corpo gorduroso do hospedeiro, entende-se que a composição da dieta do inseto (principalmente dos lipídios) afeta substancialmente a produção dos nematoides, além da presença de proteínas, sais (SHAPIRO; GAUGLER, 2002), glucose e extrato de levedura (YOO et al., 2000). O motivo disso é que 60% do total da energia dos juvenis infectantes (JIs) são derivados do metabolismo dos lipídios (TACHIBANA et al., 1997), sendo que caso as fontes de lipídios não atendam a demanda necessária, ocorre a produção subótima (abaixo do esperado) de NEPs (HATAB; GAUGLER, 2001), podendo inclusive afetar a sobrevivência e desempenho do JIs em infectar novos hospedeiros.

Produção dos nematoides entomopatogênicos

Produção in vivo – lagartas de *G. mellonella*

Inicialmente, as lagartas de *G. mellonella* são infectadas, adicionando-se 2 mL de suspensão aquosa na concentração de 200 JIs por mililitro sobre papel absorvente (tipo filtro) e, após cinco a sete dias, os insetos são transferidos para armadilhas de White (WHITE, 1927), que consistem de um sistema que tem sido aperfeiçoado, conforme

exemplo ilustrando por Negrisola Jr et al. (dados não publicados) (Figura 2), mas que baseia-se na migração dos nematoides dos cadáveres dos insetos para o filme d'água presente na armadilha.

Fotos: Ana Paula Pereira de Oliveira Silva

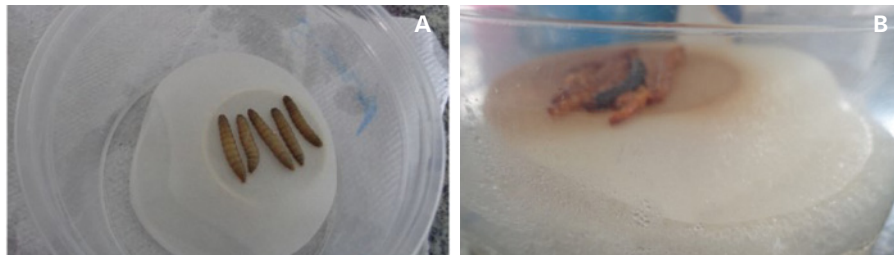


Figura 2. Armadilhas de White em coleta convencional (A) e modificada em coleta em esponja de poliuretano (B).

A padronização nos processos ou metodologias é imprescindível para que as comparações entre os resultados das pesquisas, mesmo quando for utilizado o mesmo isolado e/ou espécie de NEP, sejam válidas. Assim, o uso de diferentes substratos, arenas, concentrações e períodos de exposição dos nematoides, acarretam em diferenças significativas na susceptibilidade dos insetos hospedeiros avaliados. Essas práticas têm preocupado inúmeros pesquisadores em relação à deterioração da linhagem do nematoide, pois quando um agente de controle biológico é isolado da natureza e criado em laboratório ou produzido massalmente com propósitos comerciais, pode perder características benéficas, devido a processos genéticos, incluindo deriva, consanguinidade ou seleção inadvertida (HOPPER et al., 1993); ou seja, nematoides criados repetidamente em laboratório podem resultar na redução da qualidade dos caracteres biológicos e adaptativos (virulência, tolerância ambiental ou capacidade reprodutiva pelo inseto hospedeiro (SHAPIRO et al. 1996; STUART ; GAUGLER, 1996). Tal fato foi observado por Shapiro et al. (1996) e Wang e Grewal (2002), ao observar que *Heterorhabditis bacteriophora* sofreu a perda da tolerância ao calor, da infectividade e da fecundidade, depois de algumas multiplicações em lagartas de *G. mellonella*, através da coleta dos JIs, em laboratório. Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias para estabilizar ou evitar a perda de característica em NEPs é, portanto, de prioridade crítica, devida ser ainda nematoides

produzidos em pequena quantidade ou a nível não comercial (ANBESSE et al., 2013). Preocupações contra essa problemática devem ser desenvolvidas e empregadas, a exemplo, da manutenção da criopreservação de culturas estoque (CURRAN; BERTLER, 1992), minimização de criações em série em insetos hospedeiro e introdução de material genético selvagem na criação (GAUGLER; HAN, 2002; GAUGLER et al., 2000).

O potencial reprodutivo também deve ser considerado para o uso comercial de uma linhagem de NEP. A baixa taxa de reprodução pode dificultar a sua relação custo-eficiência em sistemas de produção em larga escala (EHLERS, 2001). Para superar essas limitações e ser capaz de ser formulado foram propostos estudos de seleção genética visando à variabilidade genética, conforme encontrada entre as populações naturais de *H. bacteriophora*. A vantagem fundamental de propagar os NEPs in vivo a partir populações previamente selecionadas é que várias linhagens podem ser produzidas com menos tempo e esforço de trabalho (ANBESSE et al., 2013). Apesar de apresentar algumas inconveniências, o processo in vivo possibilita a produção de NEPs em pequena escala visando atender os bioensaios, utilizando-se menos de mão-de-obra e de gasto de materiais, minimizando custo e tempo de produção, e assim, propiciando padrões de armazenamento prolongado, para abastecimento de bancos de germoplasma registrados e/ou coleções de trabalhos acadêmicos e/ou científicos. Essa importância também é reforçada, pois há indícios de que a qualidade do nematoide parece ser melhor quando criado em hospedeiro natural (ABU HATAB et al., 1998; ABU HATAB; GAUGLER, 2001), além de poderem adaptar-se ao hospedeiro onde são produzidos (STUART; GAUGLER, 1996).

Produção in vitro – meio de cultura

A produção de NEPs in vitro em meio de cultura, parte do princípio que os NEPs são obtidos a partir da produção inicial das bactérias simbiotes, que servem de substrato de alimentação dos nematoides, bem como os produtos da degradação do meio de cultura, formando uma “sopa” bacteriana (CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ et al., 2011). Nesse sentido, a cultura monoxênica (somente uma espécie cultivada) das

bactérias é a melhor opção para a produção em larga escala de NEPs (EHLERS, 2001; SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002), embora a melhor qualidade do JI é obtida através da cultura *in vivo*, como discutido anteriormente, porém mais adequada apenas em pequena escala de produção (ou seja, as indústrias pequenas e próximas do consumidor final) (CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ et al., 2011).

Contudo, a cultura monoxênica submersa de nematoides entomopatogênicos apresenta variações importantes na produtividade e, por isso, os esforços têm sido feitos para melhorar essa tecnologia. Especificamente, os estudos relativos à formulação do meio, a cinética de crescimento populacional do nematoide, o projeto do biorreator e as condições de funcionamento, entre outros, são necessárias para bioprocessos de produção mais confiáveis (CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ et al., 2011).

Paralelamente à produção industrial, o melhoramento genético através de técnicas tradicionais de seleção e as alterações na carga bacteriana podem ser a solução de desenvolvimento de formulações estáveis, procurando melhorar a agressividade dos nematoides e o aumento da tolerância a extremos ambientais. No entanto, é importante avaliar cuidadosamente o retorno do investimento no uso destas tecnologias devido à possibilidade da perda do *status* de agente de biocontrole “orgânico” no que diz respeito à isenção da exigência de registro do bioinseticida como que ocorre em outros países, pois no Brasil ainda há necessidade desse registro. Por outro lado, as melhorias genéticas desempenham um papel importante no esforço da maior inserção de NEPs no atual mercado de agentes de biocontrole de pragas (LACEY; GEORGIS, 2012).

Coleta e armazenamento

Os JIs podem ser armazenados por pelo menos seis meses na água em tanques refrigerados com oxigênio, mas é considerado um método com alto custo, pois são utilizados aditivos que aumentam a estabilidade, facilitam o transporte, reduzem os custos e aumentam a sobrevivência dos nematoides (GREWAL, 2002). Esses aditivos incluem ingredientes

à base de absorventes, adsorventes, agentes antimicrobianos, agentes antioxidantes, dispersantes, umectantes, preservativos, solventes, surfactantes e absorventes de ultravioleta (GREWAL, 2002). Surpreendentemente, assim como esses ingredientes, descobriu-se que a formulação à base de esponja de poliéster poliuretano também pode ser utilizada como parte do processo de armazenamento, aquém da produção de nematoides em laboratório, como já referido anteriormente, apesar de ainda ser objeto de investigações intensivas. Esse tipo de formulação é amplamente utilizado por indústrias nos Estados Unidos para armazenar e transportar pequenas quantidades de nematoides, atendendo, principalmente, aos mercados de gramados residenciais (jardim) ou campos de golfe, em aplicações a campo (GREWAL, 2002).

O armazenamento dos nematoides na forma de JIs, que não se alimentam e dependem unicamente de reserva energética para a sobrevivência (QIU; BEDDING, 1999), é favorecido pela predominância de lipídios em seus corpos como reserva de energia em longo prazo (BARRETT; WRIGHT, 1998), além de serem as principais formas de armazenamento de energia da maioria dos organismos e os principais constituintes das membranas celulares (NELSON; COX, 2011). Produtos com maior tempo de prateleira são aqueles com nematoides que são passivos na busca pelo hospedeiro, pois a estratégia de forrageamento (busca pelo hospedeiro) também afeta a escolha da formulação apropriada para as espécies de NEPs (GRIFFIN et al., 2005). Um exemplo disso é o que ocorre com a formulação em grânulos dispersíveis em água, muito bem sucedida com nematoides que são estáticos (*Steinernema carpocapsae*), pois aqueles que buscam ativamente o hospedeiro (*Steinernema feltiae* e *S. riobrave*) migram rapidamente para fora dos grânulos (GREWAL, 2002).

Conforme exposto anteriormente, a seleção inadvertida é um problema genético frequentemente observado em colônias de agentes de controle biológico mantidas em laboratório (ROUSH, 1990a). Inicialmente, NEPs eficientes são isolados no campo, passando por diversas gerações em laboratório até serem comercializados (GAUGLER, 1993). Nesse período, a adaptação às condições laboratoriais pode ser geneticamente deletéria, pois resulta na perda dos alelos adaptados às condições

naturais e implica na ineficiência destes agentes de controle biológico quando são aplicados no campo (ROUSH, 1990b). Uma forma de evitar essa seleção durante as multiplicações em laboratório é submeter a população de NEPs a um menor número possível de gerações (KAYA; GAUGLER, 1993). O método mais comum para minimizar as perdas dos alelos é estocar ou armazenar os nematoides em baixa temperatura e multiplicá-los somente quando necessário. Outra maneira é a criopreservação em nitrogênio líquido (SMITH et al., 1990; POPIEL; VASQUEZ, 1991; CURRAN et al., 1992), considerada como uma forma comum de armazenamento e manutenção de culturas de nematoides (LEWIS; CLARKE, 2012). Esta conservação é utilizada com objetivo de a longo prazo (POPIEL; VASQUEZ, 1991; CURRAN et al., 1992; NUGENT et al., 1996), prevenindo (mas não impedindo) a mudança ou a perda de características que podem ocorrer durante as sucessivas multiplicações (WANG; GREWAL, 2002). Para tanto, esta técnica é realizada com a pré-incubação do JIs em crioprotetores, minimizando a formação de cristais intra e/ou extracelularmente, além do controle preciso do congelamento e descongelamento (TRIANAPHYLLOU; MCCABE, 1989; NUGENT et al., 1996). Pelo menos duas das maiores empresas produtoras de NEPs usam esse tipo de preservação, entretanto, os efeitos específicos da manutenção em laboratório sobre a tolerância ao estresse ambiental e as condições fisiológicas não têm sido estudadas (WANG; GREWAL, 2002), ou têm sido pouco referidas.

As diferenças na persistência dos NEPs no ambiente podem ser atribuídas à luz UV e umidade do solo (dessecação), pois estes organismos são sensíveis a esses fatores e suas aplicações deverão ser no final do dia visando minimizar esse efeito, principalmente em tanto em bioensaios de campo (GREWAL, 2002; SHETLAR et al., 1988, KUNG et al., 1991, GAUGLER et al., 1992, DOWNING, 1994). Estudos reforçam que as diferentes espécies e linhagens de nematoides muitas vezes podem ser altamente sensíveis aos fatores ambientais, apresentando elevada variação quanto à sua eficácia e persistência, (MOLYNEUX, 1985, SHETLAR et al., 1988, KUNG et al., 1991, GAUGLER et al., 1992, LEWIS et al., 2006, KOPPENHOFER et al., 2007).

A maioria dos estudos de tolerância à dessecação de NEP foi realizada com o objetivo de melhorar a estabilidade de armazenamento e longevidade de produtos comerciais formulados com base no estádio de J1, porque a duração de conservação limitada desses produtos tem sido reconhecida como um impedimento principal à sua ampla utilização (LEWIS; CLARKE, 2012).

Perspectivas

Avanços na produção em larga escala, na tecnologia de formulação de NEPs, na descoberta de isolados eficazes e a conveniência de reduzir a utilização de agrotóxicos resultaram em um aumento no interesse científico e comercial pelos NEPs no mundo. Atualmente, NEPs são produzidos e comercializados por poucas empresas fora do Brasil, as quais obtêm lucros razoáveis. Um exemplo disso são duas espécies produzidas comercialmente, *Steinernema riobrave* e *Heterorhabditis indica* têm sido utilizados para o controle efetivo de algumas pragas nos Estados Unidos, bem como as espécies *Heterorhabditis bacteriophora* e *Steinernema carpocapsae*, sendo estas as mais disponibilizadas no mercado internacional. Além disso, nos últimos 15 anos, o campo de NEPs tem feito grandes progressos, com a descoberta de numerosas espécies, inclusive no Brasil, onde foram descobertas as espécies *Heterorhabditis amazonensis* e *Steinernema brasiliensis*.

No Brasil, contudo, como o interesse nos nematoides entomopatogênicos é relativamente recente, poucos são os avanços no conhecimento, desde a ocorrência de espécies nativas até a formulação de produtos comerciais, sendo necessário mais esforço nos setores de pesquisa e desenvolvimento, tecnologia e iniciativa empresarial (pública e privada). Nesse sentido, há necessidade de maior dedicação no que diz respeito a formação de profissionais qualificados para atuarem em todos os setores supracitados, aliado a um maior incentivo público-privado em programas de controle biológico com NEPs para consolidação das ações de pesquisa capazes de produzir tecnologia passível de ser transferida ao setor industrial e comercial.

Ao consideramos que até mesmo nos países onde produtos à base de NEPs têm sido utilizados por décadas, como os Estados Unidos, Alemanha e Japão, existem ainda muitos desafios e barreiras a serem ultrapassadas, fica evidente a necessidade do envolvimento da pesquisa e inovação em nosso país. Uma possibilidade para que o Brasil consiga ser competitivo nesse mercado, é a criação de convênios entre as instituições de pesquisa e tecnologia do país com instituições estrangeiras, com reconhecida competência, a fim de alavancar, principalmente a formação de profissionais que possam explorar esse potencial, tanto em vista da biodiversidade, quanto da própria agricultura brasileira.

Referências

ABU HATAB, M.; GAUGLER, R. Diet composition and lipids of in vitro produced *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biological Control**, Kentucky, USA, v. 20, p. 1-7, 2001.

ABU HATAB, M.; GAUGLER, R.; EHLERS, R. Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. **Journal of Parasitology**, Kansas, USA v. 84, p. 215-221, 1998.

ANBESSE, S.; SUMAYA, N. H.; DÖRFLER, A. V.; STRAUCH, O.; EHLERS, R.-U. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berli, Alemanha, v. 97, p. 731-739, 2013.

ANDALÓ, V.; CAVALCANTI, R. S.; MOLINA ACEVEDO, J. P.; MOINO JUNIOR, A. Avaliação de substâncias na preservação de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) em diferentes temperaturas **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n.3, p. 301-312, 2008.

ANDALÓ, V.; CAVALCANTI, R. S.; MOLINA ACEVEDO, J. P.; MOINO JUNIOR, A.; MAGALHÃES, F. H. L. Influência da aeração no armazenamento de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida) em condições de laboratório. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. n.30, n.1, p. 45-50, 2006.

ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, A.; MOLINA ACEVEDO, J. P.; CAVALCANTI, R. S.; CARVALHO, F. A. Efeito da temperatura e concentração na sobrevivência de nematoides entomopatogênicos em condições de armazenamento, visando seu uso no controle microbiano de pragas. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madri, Espanha, v. 31, n. 2, p. 253-265, 2005.

BAI, C.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; YI, S. Effect of entomopathogenic nematode concentration on survival during

cryopreservation in liquid nitrogen. **Journal of Nematology**, Loudonville, OH, v. 36, n. 3, p.281-284, 2004.

BARRETT, J.; WRIGHT, D. J. Intermediary metabolism. In: PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. (Ed.). **The physiology and biochemistry of free-living and plant parasitic nematodes**. Wallingford, UK: CAB International, 1998. p. 331-353.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, Boston, MA, v. 43, n. 5, p.363-375, 1997.

CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; MACIEL-VERGARAA, G.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, J. C.; CASTRO-ROSAS, J.; RODRÍGUEZ-PASTRANA, B. R.; TORRE-MARTÍNEZ, M. DE LA; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I. Mass production of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, through the submerged monoxenic culture in two internal-loop airlift bioreactors with some geometric differences. **Biochemical Engineering Journal**, Kansas, USA v. 55, p.145– 153, 2011.

CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; SANJUAN-GALINDO, R.; RODRÍGUEZ-PASTRANA, B. R.; MEDINA-TORRES, L.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I. Submerged monoxenic culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in an internal-loop airlift bioreactor using two configurations of the inner tube. **Biotechnology and Bioengineering**, Norfolk, UK, v. 98, p.167-176, 2007.

CHOO, H. Y.; KAYA, H. K.; HUH, J.; LEE, D. W.; KIM, H. H.; LEE, S. M.; CHOO, Y. M. Entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora*) and a fungus *Beauveria brongniartii* for biological control of the white grubs, *Ectinohoplia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf courses. **Biocontrol**, Berlin, Alemanha, v. 47, p.177-192, 2002.

CURRAN, J. C. G.; BUTLER, K. Routine cryopreservation of isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. **Journal of Nematology**, Loudonville, OH, v. 24, p. 269-270, 1992.

DOWNING, A. S. Effect of irrigation and spray volume on efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditiae) against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, MD v. 87, p. 643-646, 1994.

EBSSA, L.; KOPPENHOFER, A. M. Entomopathogenic nematodes for the management of *Agrotis ipsilon*: effect of instar, nematode species and nematode production method. **Pest Management Science**, Norfolk, UK, v. 68, p. 947-957, 2012.

EHLERS, R. U. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection, **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, Alemanha, v. 56, p. 623-633, 2001.

FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M.; SHIELDS, E. J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potencial biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, MD, v. 89, n. 2, p. 373-380, 1996.

GAUGLER, R. Ecological genetics of entomopathogenic nematodes. In: BEDDING, R., AKHURST, R., KAYA, H. (Ed.) **Nematodes and the biological control of insect pests**. East Melbourne: CSIRO Publications, 1993. p. 89-95.

GAUGLER, R.; A. BEDNAREK, J. F.; CAMPBELL. Ultraviolet inactivation of heterorhabditid and steinernematid nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, Illinois, USA, v. 59, p. 155-160, 1992.

GAUGLER, R.; Grewal, P.; Kaya, H. K.; Smith-Fiolad, D. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 17, p. 100-109, 2000.

GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. (Ed.) **Entomopathogenic nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 289-312.

GLAZER, I. Survival biology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. Wallingford, CABI Publishing, p. 169-188, 2002.

GREWAL, P. S. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R. (Ed.) **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford, UK: CAB International, 2002. p. 266-287.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, Victoria, Australia, v. 30, n. 14, p. 995-1000, 2000.

GREWAL, P. S.; POWER, K. T.; GREWAL, S. K.; SUGGARS, A.; HAUPTRICHT, S. Enhanced consistency in biological control of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) with new strains of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, Kentucky, USA, v.30, p. 73-82, 2004.

GRIFFIN, C. T.; BOEMARE, N. E.; LEWIS, E. E. Biology and Behaviour. In: GREWAL, P. S., EHLERS, R. U., SHAPIRO-ILAN, D. I. (Ed.). **Nematodes as Biocontrol Agents**. London, UK: Cabi Publishing, 2005. p. 47-64.

HATAB, M. A.; GAUGLER, R. Diet composition and lipids of in vitro produced. *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biological Control**, Kentucky, USA, v. 20, p. 1-7, 2001.

HOPPER, K. R.; ROUSH, R. T.; POWELL, W. Management of genetics of biological control introductions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, CA, v. 38, p. 27-51, 1993.

JOHNIGK, S. A.; ECKE, F.; POEHLING, M.; EHLERS, R. U. Liquid culture mass production of biocontrol nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): improved timing of dauer juvenile inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, Alemanha, v.64, p. 651-658, 2004.

KARD, B. M. R.; HAIN, F. P.; BROOKS, W. M. Field Supression of three white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) by entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, MD, v. 81, p. 1033-1039, 1988.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, CA, v. 38, p. 181-206, 1993.

KAYA, H. K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, p. 281-324, 1997.

KOPPENHÖFFER, A. M.; FUZY, E. M. Biological and chemical control of the Asiatic garden beetle, *Maladera castanea* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Economic Entomology**, Palo Alto, CA, v. 96, p. 1076-1082, 2003.

KOPPENHÖFFER, A. M.; FUZY, E. M. Effect of white grub developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. **Journal of Economic Entomology**, Palo Alto, CA, v. 97, p. 1842-1849, 2004.

KOPPENHÖFFER, A. M.; GREWAL, E. M. FUZY. Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into our white grub species. **Journal of Invertebrate Pathology**, Illinois, USA, v. 94, p. 184-192, 2007.

KUNG, S. P.; GAUGLER, R.; KAYA, H. K. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on persistence of *Steinernema* spp. **Journal Invertebrate Pathology**, Illinois, USA, v. 57, p. 242-249, 1991.

LACEY, L. A.; GEORGIS, R. Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground with Comments on Commercial Production. **Journal of Nematology**, Loudonville, OH, v. 44, n. 2, p. 218-225, 2012.

LEWIS, E. E.; CLARKE, D. J. Nematode Parasites and Entomopathogens. In: VEGA, F. E.; KAYA, H. K. **Insect Pathology**. 2 ed. Amsterdam, Holanda: Academic Press (Elsevier), 2012. p. 395-424.

LEWIS, E. E.; SHAPIRO-ILAN, D. Host cadavers protect entomopathogenic nematodes during freezing. **Journal of Invertebrate Pathology**, Illinois, USA, v. 81, n. 1, p. 25-32, 2002.

LEWIS, E. E.; J. CAMPBELL, C.; GRIFFIN, H.; KAYA, A. Peters. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, Kentucky, USA, v. 38, p.66-79, 2006.

LIESCH, P. J.; WILLIAMSON, R. C. Evaluation of chemical controls and entomopathogenic nematodes for control of *Phyllophaga* white grubs in a fraser fir production field. **Journal of Economic Entomology**, Palo Alto, CA, v. 103, n. 6, p. 1979-1987, 2010.

MOLYNEUX, A. S. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp., and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. **Revue Nématologie**, London, UK, v. 8 p. 165-170, 1985.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 805-850.

NUGENT, M. J.; O'LEARY, S. A.; BURNELL, A. M. Optimized procedures for the cryopreservation of different species of *Heterorhabditis*. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 19, p. 1-6, 1996.

PACE, G. W.; GROTE, W.; PITT, D. E.; PITT, J. M. Liquid culture of nematodes. **International Patent Application**, Zurich- SWZ WO 86/01074, 1986.

PARRA, J. R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S.B.

Controle microbiano de insetos. 2 ed. Piracicaba, SP: Editora Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 1998. 1163p.

PARKMAN, J. P.; SMART, G. C. Entomopathogenic nematodes, a case study: introduction of *Steinernema scapterisci* in Florida. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, UK, v. 6, 413-419, 1996.

PATEL, M. N.; WRIGHT, D. J. Glycogen: its importance in the infectivity of the aged juveniles of *Steinernema carpocapsae*. **Parasitology**, Cambridge, UK, v. 114, p. 591-596, 1997.

POPIEL, I.; VASQUEZ, E. M. Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. **Journal of Nematology**, Loudonville, OH, v.23, p. 432-437, 1991.

QIU, L. H.; BEDDING, R. A. The relationship between the survival and the energy metabolism of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under both aerobic and anaerobic conditions. **Survival of Entomopathogenic Nematodes**, Wellesbourne, Warwick, UK, p. 148-159, 1999.

ROUSH, R. T. Genetic consideration in the propagation of entomophagous species. In: BAKER, R. R., DUNN, P. E. (Ed.). **New Directions in biological control**. New York: A. R. Liss, 1990a. p. 373-387.

ROUSH, R. T. Genetic variation in natural enemies: Critical issues for colonization in biological control. In: EHLER, L., MACKAUER, M. (Ed.). **Critical issues in biological control**. Andover, UK: Intercept, 1990b. p. 263-288.

SHAPIRO, D. I.; GLAZER, I.; SEGAL, D. Trait stability and fitness of the heat tolerant entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* IS-5 strain. **Biological Control**, Kentucky, USA, v. 6, p. 238-244, 1996.

SHAPIRO-LLAN, D. I.; GAUGLER, R. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, Alemanha, v. 28, p. 137-146, 2002.

SHETLAR, D. J. P. E.; SULEMAN R. GEORGIS. Irrigation and use of entomogenous nematodes, *Neoplactana* spp. and *Heterorhabditis heliothidis* (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for control of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in turfgrass. **Journal of. Economic Entomology**, Palo Alto, CA, v. 81, p. 1318-1322, 1988.

SMITH, B. S.; HODGSON-SMITH, A.; POPIEL, I.; MINTER, D. M.; JAMES, E. R. Cryopreservation of the entomogenous nematode parasite *Steinernema feltiae* (= *Neoaplectana carpocapsae*). **Cryobiology**, Luton, UK, v. 27, p. 319-327, 1990.

STUART, R. J.; GAUGLER, R. Genetic adaptation and founder effect in laboratory populations of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. **Canadian Journal Zoology**, Ottawa, Canada, v. 74, p. 164-170, 1996.

TRIANAPHYLLOU, A. C.; MCCABE, E. Efficient preservation of root-knot and cyst nematodes in liquid nitrogen. **Journal of Nematology**, Loudonville, OH, v. 21, p. 423-436, 1989.

TACHIBANA, M. et al. Nematoda cultivating method. **US Patent**, n. 5, p. 694-833, 1997.

WANG, X.; GREWAL, P. S. Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance. **Biological Control**, Kentucky, USA, v. 23, p. 71-78, 2002.

WANG, X.; GREWAL, P. S. Rapid Genetic Deterioration of Environmental Tolerance and Reproductive Potential of an Entomopathogenic Nematode During Laboratory Maintenance. **Biological Control**, Kentucky, USA, v. 23, p. 71-78, 2002.

WESTERMAN, P. R. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20°C and effects on efficacy. **Journal of Invertebrate Pathology**, Illinois, USA, v. 73, n. 2, p. 206-213, 1999.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, Washington, D.C., v. 66, p. 302-303, 1927.

WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. Physiology and biochemistry. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 145-168.

YOO, S. J. et al. Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, Alemanha, v. 54, p. 759-763, 2000.



Tabuleiros Costeiros

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

